

METHOD FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCE AND REAGENT KIT THEREFOR**Publication number:** JP5146299**Publication date:** 1993-06-15**Inventor:** AONO TOSHIYA; TAKARADA YUTAKA; SHIBATA HIDEJI**Applicant:** TOYO BOSEKI**Classification:****- international:** C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; C12N15/09; C12N15/10; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/10; C12Q1/68**- European:****Application number:** JP19910339872 19911127**Priority number(s):** JP19910339872 19911127

Report a data error here

Abstract of JP5146299

PURPOSE: To simply and efficiently amplify the target nucleic acid sequence according to a specific method using a cyclic single-stranded nucleotide, a primer having a sequence complementary to that of the nucleotide and a thermostable DNA polymerase. **CONSTITUTION:** (A) A cyclic single-stranded nucleotide, (B) a primer having a sequence complementary to that of the nucleotide and (C) a thermostable DNA polymerase are used to elongate the primer (B) annealed in the nucleotide (A). Thereby, a single-stranded nucleic acid having a repeated sequence complementary to that of the nucleotide (A) is produced. Specifically, the nucleotide (A) and the primer (B) are preferably annealed and the annealed primer (B) is then elongated with the enzyme (C) using the nucleotide (A) as a template to amplify the nucleic acid sequence.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-146299

(43) 公開日 平成5年(1993)6月15日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	A	8114-4B		
C 1 2 N 15/10		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数9(全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平3-339872

(22) 出願日 平成3年(1991)11月27日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 青野 利哉

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 柴田 秀司

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(54) 【発明の名称】 核酸配列の増幅方法およびそのための試薬キット

(57) 【要約】

【目的】 標的核酸を簡便に増幅する。

【構成】 環状一本鎖ヌクレオチド (A)、該ヌクレオチド (A) と少なくとも部分的に相補的な配列を有するプライマー (B) または断片化した標的核酸配列 (D) および耐熱性ポリメラーゼ (C) を使用して、環状一本鎖ヌクレオチド (A) にアニールしたプライマー (B) または断片化した標的核酸配列 (D) を伸長させることにより、環状一本鎖ヌクレオチド (A) と相補的な配列を繰り返した配列を有する一本鎖核酸配列を生成させる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 環状一本鎖ヌクレオチド(A)、該環状一本鎖ヌクレオチド(A)と少なくとも部分的に相補的な配列を有するプライマー(B)および耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、該環状一本鎖ヌクレオチド(A)にアニールした該プライマー(B)を伸長させることにより、環状一本鎖ヌクレオチド(A)と相補的な配列を繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより核酸配列を増幅することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項2】 検体試料中の標的核酸配列(D)、該標的核酸配列(D)と少なくとも部分的に相補的な配列を有する環状一本鎖ヌクレオチド(A)および耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、環状一本鎖ヌクレオチド(A)にアニールした標的核酸配列(D)をプライマーとして、環状一本鎖ヌクレオチド(A)と相補的な配列を繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより核酸配列を増幅することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項3】 環状一本鎖ヌクレオチド(A)、該環状一本鎖ヌクレオチド(A)と少なくとも部分的に相補的な配列を有するプライマー(B)および耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、下記の操作(a)~(d)を行なうことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a): 環状一本鎖ヌクレオチド(A)と上記プライマー(B)をアニールさせる。

操作(b): 環状一本鎖ヌクレオチド(A)を鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、操作(a)でアニールしたプライマー(B)を伸長させ、核酸配列を増幅させる。

操作(c): 増幅された核酸配列を断片化する。

操作(d): 必要に応じて、断片化した核酸配列をプライマーとして用いて、上記操作(a)~(c)を少なくとも1回繰り返す。

【請求項4】 検体試料中の標的核酸配列(D)、該標的核酸配列(D)と少なくとも部分的に相補的な配列を有する環状一本鎖ヌクレオチド(A)および耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、下記の操作(a)~(e)を行なうことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a): 標的核酸配列(D)を断片化する。

操作(b): 断片化した標的核酸配列(D)と上記環状一本鎖ヌクレオチド(A)をアニールさせる。

操作(c): 環状一本鎖ヌクレオチド(A)を鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、操作(b)でアニールした断片化した標的核酸配列(D)をプライマーとして伸長させ、核酸配列を増幅させる。

操作(d): 生成した核酸配列を断片化する。

操作(e): 必要に応じて、断片化した核酸配列をプライマーとして用いて、上記操作(b)~(d)を少なくとも1回繰り返す。

2

【請求項5】 耐熱性DNAポリメラーゼがヘリカーゼ様活性を持つポリメラーゼであることを特徴とする請求項1~4の核酸配列の増幅方法。

【請求項6】 耐熱性DNAポリメラーゼが環状DNAを鋳型として高温で作用させた場合、DNAの合成を行いながら鋳型を一周した後、先に合成したDNAを剥がしながら合成し続ける活性を有しているヘリカーゼ様活性を持つポリメラーゼであることを特徴とする請求項1~5の核酸配列の増幅方法。

10 【請求項7】 検体試料中の標的核酸配列(D)と少なくとも部分的に相補的な配列を有する環状一本鎖ヌクレオチド(A)、耐熱性DNAポリメラーゼ(C)およびデオキシリボヌクレオシド三リン酸を含む核酸配列増幅用試薬キット。

【請求項8】 耐熱性DNAポリメラーゼがヘリカーゼ様活性を持つポリメラーゼであることを特徴とする請求項7の核酸配列増幅用試薬キット。

【請求項9】 耐熱性DNAポリメラーゼが環状DNAを鋳型として高温で作用させた場合、DNAの合成を行いながら鋳型を一周した後、先に合成したDNAを剥がしながら合成し続ける活性を有しているヘリカーゼ様活性を持つポリメラーゼであることを特徴とする請求項7~8の核酸配列増幅用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は核酸配列の増幅方法およびそのための試薬キットに関する。本発明は、特に塩基配列が既知の核酸をその初期に存在する量に比較して、より大量に生成させる方法に関する。本発明を実施することにより遺伝病、癌、感染症などの診断を行うことが容易となる。

【0002】

【従来技術】 ハイブリダイゼーションによる核酸配列の検出は遺伝病、癌、感染症などの診断のために有効な手段として汎用されるようになってきた。標的とする塩基配列は、対象となる核酸のほんの僅かな部分である場合があり、非放射性標識プローブや末端を放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いた場合、感度上の問題等によりその検出が困難である場合がある。

40 そのため、プローブ検出システムの感度を向上させるための努力が多くなされている(WO87/03622など)。また、感度向上の手段として、目的とする核酸配列をDNAポリメラーゼにより増幅させる方法(特開昭61-274697号公報;以下「PCR」と略することがある)が開示された。しかしこの方法では、複雑な温度の調節が必要であり、専用の機器を必要とするという欠点がある。DNAリガーゼを用いる核酸配列の増幅法も開示された(WO89/12696、特開平2-2934号公報など)。しかし、この方法ではDNAリガーゼが平滑末端を連結する反応(blunt end ligation)が

3

起こる。この回避法としてWO89/12696では3組以上のプローブを用いているがプローブ数が多くコスト高となってしまう。また、RNAポリメラーゼを用いてDNAよりRNAが生成されることは周知であり、RNAポリメラーゼを用いて核酸配列の増幅を行う方法も開示されている(WO89/01050)。しかしながら、この方法ではRNAポリメラーゼによる転写増幅のみでは十分な増幅は困難である。従って、生成したRNAに再度逆転写酵素を作用させDNAを生成させる操作を実施している。一方、目的とする核酸配列にプローブをハイブリダイズさせた後、正しくハイブリダイズしたプローブのみを増幅する方法(BIO/TECHNOLOGY, vol. 6, 1197, 1988)も知られている。しかしこの方法では、非特異反応により結合したプローブも増幅され、ブランク値の上昇をきたすという問題がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、標的とする核酸配列を簡便に増幅させる方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らはこれらの課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、ある種の耐熱性DNAポリメラーゼには環状DNAを鋳型として比較的高温で作用させた場合、合成を行ないながら鋳型を一周した後、先に合成したDNAを剥しながら合成し続ける活性を有していることを発見した。この発見をもとに、標的核酸(D)と少なくとも部分的に相補的な環状一本鎖ヌクレオチド(A)および耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いることにより、上記課題が解決されることを見出して、本発明を完成させるに至った。

【0005】すなわち、本発明は環状一本鎖ヌクレオチド(A)、該環状一本鎖ヌクレオチドと少なくとも部分的に相補的な配列を有するプライマー(B)および耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、該環状一本鎖ヌクレオチド(A)にアニールした該プライマー(B)を伸長させることにより、環状一本鎖ヌクレオチド(A)と相補的な配列を繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより核酸配列を増幅することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。また本発明は、検体試料中の標的核酸配列(D)、該標的核酸配列(D)と少なくとも部分的に相補的な配列を有する環状一本鎖ヌクレオチド(A)および耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、環状一本鎖ヌクレオチド(A)にアニールした標的核酸配列(D)をプライマーとして、環状一本鎖ヌクレオチド(A)と相補的な配列を繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより核酸配列を増幅することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。さらに本発明の核酸配列を増幅するための試薬キットは、検体試料中の標的核酸配列(D)と少なくとも部分的に

4

相補的な配列を有する環状一本鎖ヌクレオチド(A)、耐熱性DNAポリメラーゼ(C)およびデオキシリボヌクレオシド三リン酸を含む核酸増幅用試薬キットである。

【0006】本発明で用いる環状一本鎖ヌクレオチド(A)は、長さ、配列等に特に制限されない。また人工的に合成した核酸でも、例えば、ウィルスDNAやプラスミドDNAに由来する天然の核酸であってもよい。標的核酸配列(D)をプライマーとして利用する場合、環状一本鎖ヌクレオチド(A)は、標的核酸配列(D)と相補的なアニール部分が、長さ、6~100ヌクレオチド、好ましくは10~40ヌクレオチドのものが使用される。また大きさは一般的に50~10000ヌクレオチド、好ましくは100~5000ヌクレオチドであればよい。

【0007】本発明で用いる環状一本鎖ヌクレオチド(A)と少なくとも部分的に相補的な配列を有するプライマー(B)は、少なくともその一部の配列が環状一本鎖ヌクレオチド(A)と相補的であれば、長さ、構造等に制限されない。人工的に合成された核酸であっても、天然に由来する核酸であってもよい。環状一本鎖ヌクレオチド(A)との相補的な部分は、6~100ヌクレオチド、好ましくは10~40ヌクレオチドの長さのものが用いられる。

【0008】本発明で使用する耐熱性DNAポリメラーゼ(C)は、環状DNAを鋳型として比較的高温で作用させた場合、合成を行ないながら鋳型を一周した後、先に合成したDNAを剥しながら合成し続ける活性を有しているヘリカーゼ様活性を持つポリメラーゼであれば特に制限されない。例えばTth(Thermus thermophilus) DNAポリメラーゼ(Eur. J. Biochem., 149, 41, (1985))、Taq(Thermus aquaticus) DNAポリメラーゼ(J. Bacteriol., 127, 1550, (1976))、Vent(Thermococcus litoralis) DNAポリメラーゼ、Bst(Bacillus stearothermophilus) DNAポリメラーゼなどが使用できる。また耐熱性でなくともφ29 DNAポリメラーゼ、M2 DNAポリメラーゼなどのヘリカーゼ様活性を有する酵素であれば、本発明に使用可能である。反応の温度は、使用する酵素に応じて設定されるが一般的には40℃~90℃、好ましくは、60℃~80℃で行われる。

【0009】本発明で使用する標的核酸配列(D)は断片化して、DNAポリメラーゼ(C)のプライマーとして機能できれば、長さ、構造等に特に制限されない。環状一本鎖ヌクレオチド(A)と相補的な配列の内部または端部に制限酵素による切断部位を有していることが望ましい。

【0010】本発明の核酸増幅法は、環状一本鎖ヌクレオチド(A)、該環状一本鎖ヌクレオチドと少なくとも部分的に相補的な配列を有するプライマー(B)および

5

耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、下記の操作(a)~(d)を行なう。

操作(a):環状一本鎖ヌクレオチド(A)と上記プライマー(B)をアニールさせる。

操作(b):環状一本鎖ヌクレオチド(A)を鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、操作(a)でアニールしたプライマー(B)を伸長させ、核酸配列を増幅させる。

操作(c):増幅された核酸配列を断片化する。

操作(d):必要に応じて、断片化した核酸配列をプライマーとして用いて、上記操作(a)~(c)を少なくとも1回繰り返す。

【0011】また本発明の核酸増幅法は、試料中の標的核酸配列(D)、該標的核酸配列(D)と少なくとも部分的に相補的な配列を有する環状一本鎖ヌクレオチド(A)および耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、下記の操作(a)~(e)を行なう。

操作(a):標的核酸配列(D)を断片化する。

操作(b):断片化した標的核酸配列(D)と上記環状一本鎖ヌクレオチド(A)をアニールさせる。

操作(c):操作(b)でアニールした標的核酸配列(D)をプライマーとし、環状一本鎖ヌクレオチド(A)を鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて反応させ、核酸配列を増幅させる。

操作(d):生成した核酸配列を断片化する。

操作(e):必要に応じて、断片化した核酸配列をプライマーとして用いて、上記操作(b)~(d)を少なくとも1回繰り返す。

【0012】本発明を図1に基づいて説明する。尚、図中Aは環状一本鎖ヌクレオチド、Bはプライマー、Cは耐熱性DNAポリメラーゼを示す。

操作(a):環状一本鎖ヌクレオチド(A)にプライマー(B)をアニールさせる。アニールは最大の選択性をもたらすように、選択された温度において行われる。一般的には環状一本鎖ヌクレオチド(A)とプライマー(B)が特異的に結合し、かつミスマッチによる非特異的結合が最小となるように昇温させて行う。

操作(b):操作(a)でアニールしたプライマー(B)を、環状一本鎖ヌクレオチド(A)を鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて伸長させ、核酸配列を増幅させる。当該操作は、例えばdNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)の4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸)および耐熱性DNAポリメラーゼ(例えばThermus thermophilus DNAポリメラーゼ、Thermus aquaticus DNAポリメラーゼ等)を用いて、該環状ヌクレオチドを鋳型にして伸長反応を行わせることにより行われる。これらの酵素は、高温で反応させることによりDNAの二重鎖の部分を開きながらプライマー伸長物の合成を進めていくことができる。

操作(c):増幅された核酸配列を断片化する。

6

操作(d):必要に応じて、断片化した核酸配列をプライマーとして用いて、上記操作(a)~(c)を少なくとも1回繰り返す。

【0013】本発明を図2を用いて説明する。尚、図中Aは環状一本鎖ヌクレオチド、Dは標的核酸配列、Cは耐熱性DNAポリメラーゼを示す。

操作(a):標的核酸配列(D)を断片化する。

操作(b):断片化した標的核酸配列(D)と上記環状一本鎖ヌクレオチド(A)をアニールさせる。

10 操作(c):環状一本鎖ヌクレオチド(A)を鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼ(C)を用いて、操作(b)でアニールした断片化した標的核酸配列(D)をプライマーとして伸長させ、核酸配列を増幅させる。

操作(d):生成した核酸配列を断片化する。

操作(e):必要に応じて、断片化した核酸配列をプライマーとして用いて、上記操作(b)~(d)を少なくとも1回繰り返す。

【0014】

20 【発明の効果】本発明の増幅法によれば、ヘリカーゼ様活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼを用いることにより、環状一本鎖ヌクレオチド1分子から複数の核酸配列が生成されるので効率よく増幅することが可能である。また、本発明の増幅法は複雑な温度の調節や、専用の機器を必要としない。さらに、本発明の増幅法は、プローブを増幅する方法ではないので、ミスマッチや非特異的ハイブリダイゼーションにより残存したプローブの増幅がなく、S/N(Signal/Noise)比を増加させることができる。

【0015】

30 【実施例】以下に、本発明の実施例及び比較例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとするが、これら実施例によって本発明の範囲は限定されない。

(実施例1)常法により精製した一本鎖ブルースクリプトKS+DNAを環状一本鎖ヌクレオチド(A)として、M13primer P1(東洋紡製)をプライマー(B)として、以下の操作を行った。

操作(a)

40 環状一本鎖ヌクレオチド(A)1 pmolに、プライマー(B)10 pmolを反応液20 μ lに加えた。94℃に2分間保った後、50℃に5分間保温し、アニールさせた。

反応液

10 mM	Tris-HCl (pH 8.9)
1.5 mM	MgCl ₂
80 mM	KCl
500 μ g/ml	BSA
0.1%	コール酸ナトリウム
0.1%	Triton X-100
2 mM	dATP, dGTP, dCTP, dTTP

50 操作(b)

7

上記反応液に、Tth DNAポリメラーゼ（東洋紡製）4単位を加え、75℃で60分間保温し、プライマーを伸長させた。

操作(c)

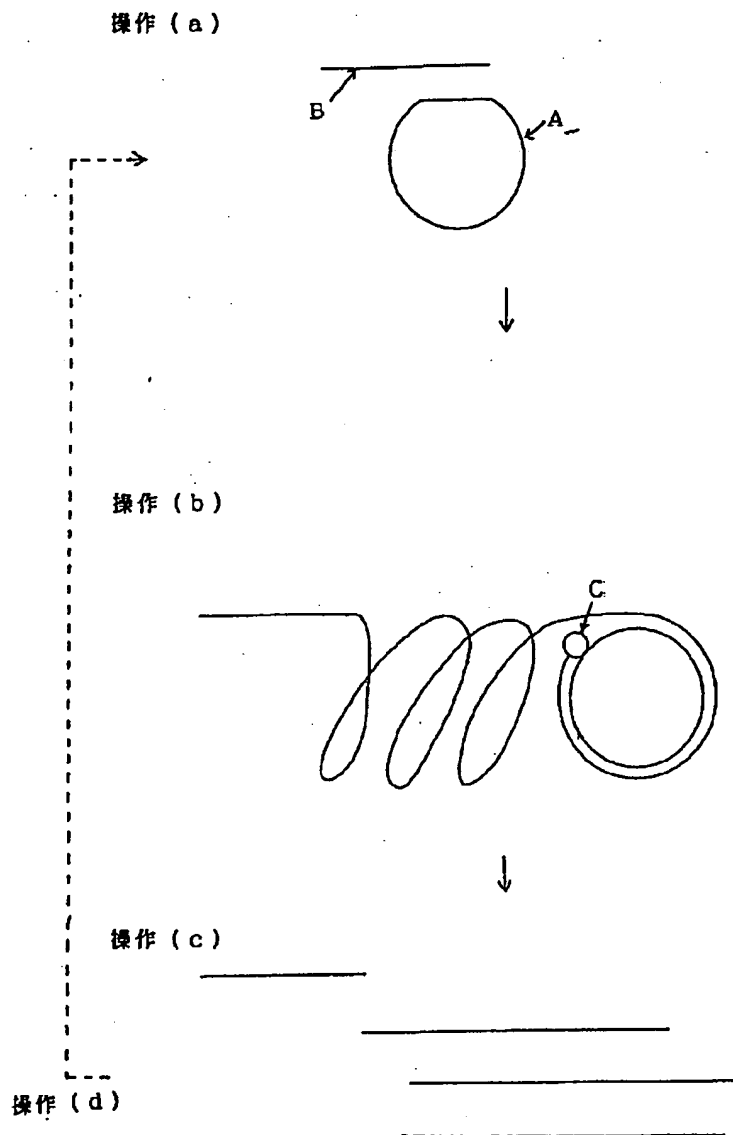
その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成されたDNAを確認した。結果は反応開始後、0分（レーン2）では、鋳型の環状一本鎖ヌクレオチド（A）しか存在しないが、30分（レーン3）、60分（レーン4）保温した後では、鋳型より高分子側にスメア状にDNAが合成されていた。このことはプライマー（B）が環状一本鎖ヌクレオチド（A）を鋳型として伸長され、核酸配列が増幅されたことを示している。

8

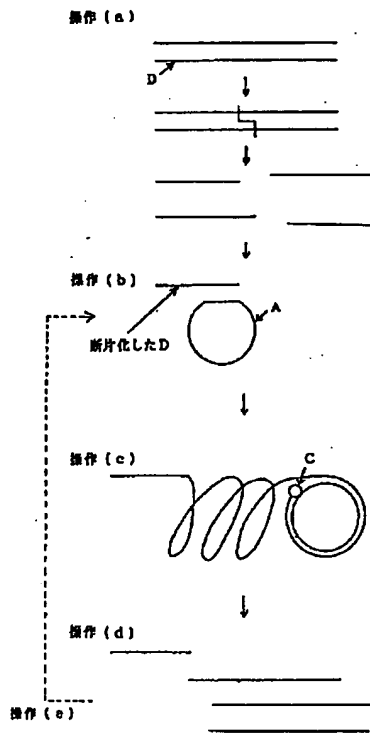
【図面の簡単な説明】

図1は本発明の原理を模式的に示した図である。図中、Aは環状一本鎖ヌクレオチド、Bはプライマー、Cは核酸ポリメラーゼを示す。図2は本発明の原理を模式的に示した図である。図中、Dは標的核酸配列、Aは環状一本鎖ヌクレオチド、Bはプライマー、Cは核酸ポリメラーゼを示す。図3は実施例1において合成されたDNAの電気泳動パターンを示す。レーン1はマーカーDNA（λ-Hind III）、2、3、4はそれぞれ75℃で0分、30分、60分保温した場合のパターンに対応している。矢印は、鋳型として用いた環状一本鎖ヌクレオチド（A）の位置を示す。

【図1】



【図2】



【図3】

